



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C08B 37/04	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/09566
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Februar 2000 (24.02.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05867	(81) Bestimmungsstaaten: CA, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. August 1999 (12.08.99)	
(30) Prioritätsdaten: 198 36 960.3 14. August 1998 (14.08.98) DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(71)(72) Anmelder und Erfinder: ZIMMERMANN, Ulrich [DE/DE]; Pfarrer-Fröhlich-Strasse 17, D-97295 Waldbrunn (DE).	
(72) Erfinder; und	
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BEHRINGER, Marcus [DE/DE]; Ludwig-Seufert-Strasse 431, D-97299 Zell/Main (DE).	
(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, D-80799 München (DE).	

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ULTRA-PURE ALGINATES

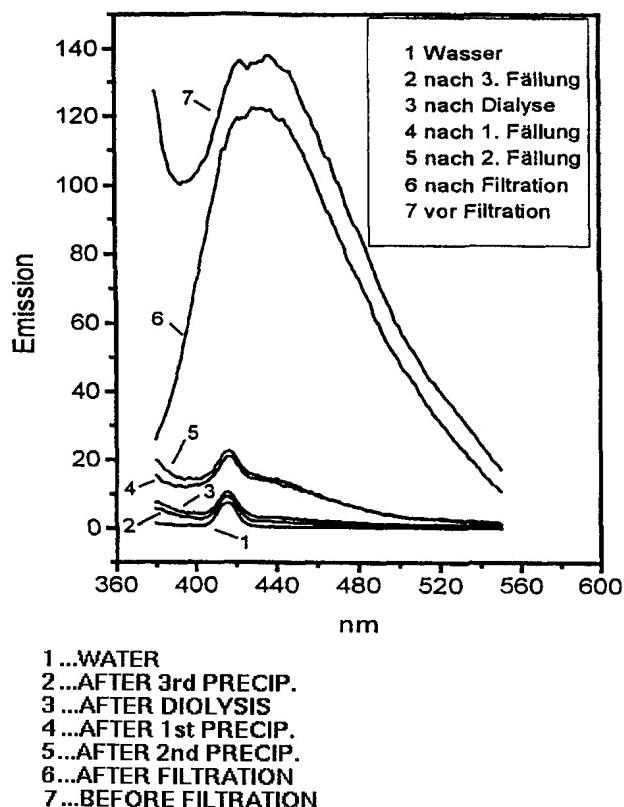
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG HOCHGEREINIGTER ALGINATE

(57) Abstract

The present invention relates to a method for obtaining a composition of ultra-pure alginate, wherein said method comprises the following steps: extracting a material consisting of algae or raw alginate using a complexing agent in a solution; allowing the cellular constituents and the particles contained in the solution to settle; filtering the solution; precipitating the alginate contained in the solution and recovering the precipitated alginate. An alginate composition in the form of a mixed polymer consisting of mannuronic and guluronic acids has a ratio between the mannuronic acid and the guluronic acid of about 1 to 90 % and an average molecular weight of 1000 kD or above.

(57) Zusammenfassung

Ein Verfahren zur Gewinnung einer hochgereinigten Alginatzusammensetzung enthält die Schritte: Extrahieren von Algenmaterial oder Rohalginat mit einem Komplexbildner in einer Lösung, Sedimentieren von Zellbestandteilen und Partikeln aus der Lösung, Filtern der Lösung, Ausfällen von Alginat aus der Lösung und Sammeln des gefällten Alginats. Eine als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure bestehende Alginatzusammensetzung besitzt ein Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure im Bereich von 1 % bis 90 % und ein mittleres Molekulargewicht bis zu oder oberhalb von 1.000 kD.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginate

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginate, insbesondere aus Braunalgen, und mit diesem Verfahren hergestellte Alginate mit einem hohen Polymerisationsgrad sowie deren Verwendung.

Alginate besitzen zahlreiche Anwendungen im Bereich der Lebensmitteltechnik (z.B. Askar in "Alimenta", Bd. 21, 1982, S. 165 ff.) und in der Textiltechnik, in zunehmendem Maße jedoch auch in der Pharmazie, Medizin, Biochemie und Biotechnologie. Die nach den bisher bekannten Verfahren aus Algenpflanzen gewonnenen Alginate (Übersicht beispielsweise in D.J. McHugh: "Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds" in "FAO Fisheries Technical Papers", Bd. 288, 1987, Chap. 2) sind durch Schwankungen der Zusammensetzung und der Struktur sowie durch Verunreinigungen gekennzeichnet. Dies ergibt sich daraus, daß das Rohalginat aus Biomasse extrahiert wird, die aus Wildpopulationen gewonnen wird. Die insbesondere in Küstengewässern wachsenden Algenpopulationen sind zahlreichen geographischen, saisonalen und stofflichen (Umweltverschmutzung) Einflüssen ausgesetzt. Hinzu kommt, daß bei der Ernte die Algen ggf. gemeinsam mit Fremdstoffen eingesammelt und zur Konservierung bzw. zur Entfärbung einer chemischen Behandlung (z.B. mit Formalin und/oder Hypochlorid) unterzogen werden.

Die bis jetzt verfügbaren Rohalginate sind daher Mischpolymere variabler Struktur mit Verunreinigungen, zu denen insbesondere toxische Chemikalien zählen können. Da in der Lebensmittel- und Textiltechnik vorrangig Interesse an den gelbindenden Eigenschaften der Alginate besteht, wurden Verfahren

zur Nachreinigung oder Reinigung der Rohalginate, wie sie im folgenden erläutert werden, erst für die biologisch-medizinischen Anwendungen entwickelt.

Verfahren zur Reinigung von Alginaten (wie sie z.B. von den Unternehmen Keltone LV oder Kelco Nutrasweet verfügbar sind) werden beispielsweise in DE-OS 4 204 012, US-A 5 429 821 (bzw. US-A 5 656 468) und in der Publikation von P. De Vos et al. in "Diabetologia" (Bd. 40, 1997, S. 262 ff.) beschrieben. Diese Verfahren besitzen generell die Nachteile eines hohen Energieaufwandes (Anwendungen einer Elektrophorese, Gefriertrocknung oder Zentrifugation, Erhitzung oder Kochen), einer hohen Umweltbelastung (Verwendung von Säuren wie HCl, H₂SO₄, biologisch nicht-abbaubaren Lösungsmitteln wie CHCl₃ oder Schwermetallionen wie beispielsweise Barium, Blei oder Cadmium) und einer Beschränkung des erzielbaren mittleren Molekulargewichts des gereinigten Endmaterials. Weitere Nachteile der herkömmlichen Verfahren ergeben sich im einzelnen aus den folgenden Erläuterungen:

Bei dem aus DE-OS 42 04 012 bekannten Verfahren wird eine Rohalginatlösung einer Behandlung mit einem Komplexbildner, einer Säureextraktion bei hohen Temperaturen (rund 70 °C), einer Waschung, einer Behandlung mit konzentriertem Alkohol (rund 80 %) und einer weiteren Behandlung mit einem Komplexbildner ausgesetzt. Anschließend folgt ein Dialysevorgang und eine Gefriertrocknung (oder Elektrophorese oder Zentrifugation) zur Gewinnung des gereinigten Alginats. Dieses Verfahren ist wegen des hohen Energieaufwands, der großen Anzahl von Verfahrensschritten, dem Einsatz von toxischen Materialien (z.B. Barium als Komplexbildner) und der Beschränkung auf Alginat (< 500 kD) nachteilig. Ein besonderes Problem ist jedoch, daß der Reinigungseffekt dieses Verfahrens nur beschränkt ist.

In DE-OS 42 04 012 werden die gereinigten Alginat zwar als mitogenfreie Substanzen benannt, dies jedoch lediglich unter der Annahme einer Mitogenfreiheit, falls in vorbestimmten Tierversuchen keine Entzündungsreaktionen beobachtet werden, sowie einer Unbedenklichkeit weiterer Komponenten, die im hochgereinigen Alginat verblieben. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die am Ende der 80er Jahre entwickelten und in DE-OS 42 04 012 implementierten Tierversuche nicht geeignet sind, eine Mitogenfreiheit nachzuweisen, die den Anforderungen der modernen biomedizinischen Anwendungen, z.B. der Implantationstechnik, erfüllt. So wurden die Tierversuche beim herkömmlichen Reinigungsverfahren mit sogenannten Lewis-Ratten durchgeführt. Inzwischen konnte jedoch durch G. Klöck et al. in "Biomaterials" (Bd. 18, 1997, S. 707ff) und durch P. Gröhn (Dissertation Universität Würzburg, 1998) nachgewiesen werden, daß die Lewis-Ratten eine relativ geringe Empfindlichkeit gegenüber mitogenen Substanzen besitzen. Implantierte Alginat-Kapseln, die bei Lewis-Ratten nach drei Wochen keine Entzündungsreaktionen auslösten, führten beispielsweise bei sogenannten BB-OK-Ratten ("Bio Breeding / Ottawa Karlsburg") zu Entzündungsreaktionen. Daraus ergibt sich, daß die aus DE-OS 42 04 012 bekannten mitogenfreien Substanzen tatsächlich nicht als hochgereinigt betrachtet werden können und wegen verminderter Biokompatibilität bei biomedizinischen Anwendungen nur beschränkt einsetzbar sind.

Bei dem aus US-A 5,429,821 bzw. US-A 5,656,468 bekannten Reinigungsverfahren wird ebenfalls eine Säurefällung durchgeführt. Es sind wiederum Hochtemperaturverfahrensschritte und zur endgültigen Alginatgewinnung eine Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung erforderlich. Die nach diesem Verfahren gewonnenen Alginat sind auf Molekulargewichte unterhalb 200 kD beschränkt. Es folgt eine Trocknung bei 80°C, bei der im Mischpolymer Trocknungsartefakte durch Struktur- oder Stoffumsetzungen entstehen können.

Ein besonderes Problem stellt die Beschränkung auf relativ geringe Molekulargewichte dar. So ist beispielsweise aus "Immobilized Enzymes" von J. Chibata (A Halsted Press Book, John Wiley & Sons, 1978) bekannt, daß die Bio-Toxizität von Materialien mit der Zunahme des Molekulargewichts abnimmt.

Schließlich ist auch das oben genannte Verfahren nach P. de Vos et al. durch zahlreiche Verfahrensschritte, einschließlich einer Säurefällung, dem Einsatz toxischer Chemikalien (Chloroform), die Verwendung hochkonzentrierten Ethanols (rund 70%) und die Anwendung einer Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung gekennzeichnet.

Ein weiterer Nachteil sämtlicher Reinigungsverfahren besteht in deren Beschränkung auf die Reinigung kommerziell verfügbarer Rohalginate. Die Verfahren sind nicht auf Frischmaterial oder geerntete Biomasse anwendbar. Außerdem sind die Verfahren aufgrund der umständlichen Verfahrensführung, des Energieaufwands und dem Einsatz toxischer Chemikalien für eine großtechnische Anwendung nicht praktikabel.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginate anzugeben, mit dem die Nachteile herkömmlicher Reinigungsverfahren vermieden werden und die Herstellung eines hochgereinigten Alginats, insbesondere in großtechnischem Maßstab, ermöglicht wird. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, ein neuartiges Alginat, insbesondere mit einem gegenüber den herkömmlichen Alginaten erhöhten Molekulargewicht, bzw. einer erhöhten Viskosität, anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren bzw. eine Alginatzusammensetzung mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 16 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Unter einem hochgereinigten Alginat wird hier eine reproduzierbar herstellbare Alginatzusammensetzung verstanden, die vorbestimmte Molekulargewichts- und/oder Viskositätsparameter besitzt und eine hohe Sterilität, Reinheit und Biokompatibilität aufweist. Letzteres Merkmal bezieht sich beispielsweise darauf, daß mit erfindungsgemäß hochgereinigten Alginaten in autoimmundiabetischen BB/OK-Ratten auch nach mehrwöchiger Implantation keine oder eine vernachlässigbar geringe Fremdkörperreaktion ausgelöst wird.

Im Unterschied zu den herkömmlichen Reinigungsverfahren, die sämtlich an kommerziell verfügbare Rohalginate angepaßt sind, die jedoch Verschnitte oder Mischungen aus verschiedenen Algenmaterialien unter Einschluß von tierischen oder anderen Fremdmaterialien darstellen und somit grundsätzlich nicht hochgereinigtes Alginat ergeben können, wird erfindungsgemäß eine Alginatherstellung oder -gewinnung angegeben, die vorzugsweise von sauberem Algenfrischmaterial oder getrocknetem Algenmaterial als Ausgangsstoff ausgeht. Es ist insbesondere vorgesehen, daß zunächst das Algenmaterial in Gegenwart von Komplexbildnern behandelt wird, worauf mit einem Bindemittel in Form eines Granulats oder einem vergleichbaren porösen Material Zellbestandteile und Partikel sedimentiert werden. Nach einer Filtration erfolgt ein Fällungsschritt, vorzugsweise unter gleichzeitigem Einblasen eines Trägergases, unter dessen Wirkung das ausgefällte Alginat auf der Lösung aufschwimmt. Dieses Aufschäumen (Floatieren) ist nicht zwingend erforderlich. Ausgefällt Alginat kann auch anderweitig aus der Lösung getrennt werden (z.B. durch einen Dekantierzvgang). Das derart gewonnene Alginat kann von der Lösungsoberfläche abgenommen oder als Rückstand nach dem Dekantieren aufgenommen und an Luft oder mit einer Filterpresse entwässert werden. Je nach Anwendungsfall wird dieser Reinigungsvorgang bzw. Teilschritte dieses Reinigungsvorgangs einmalig

oder mehrmals durchgeführt. Nach der letzten Reinigung erfolgt ein abschließendes Waschen und Lufttrocknen.

Diese Verfahrensweise besitzt die folgenden Vorteile. Bei der Alginatgewinnung wird vollständig auf toxische Chemikalien und Hochtemperaturbedingungen verzichtet. Die einzelnen Verfahrensschritte basieren auf an sich bekannten und einfach beherrschbaren Techniken, deren erfindungsgemäße Kombination besonders vorteilhaft in Bezug auf die Verfahrenskosten, den Materialaufwand und die Prozeßgeschwindigkeit ist. Es wird erstmalig im Gegensatz zu allen herkömmlichen Reinigungsversuchen eine Biokompatibilität des gewonnenen Alginatmaterials erreicht, so daß sich dessen Anwendungsgebiet erheblich, insbesondere in der Biologie und Medizin, erweitert. Das erfindungsgemäß hergestellte, biokompatible Produkt basiert ausschließlich auf Alginat. Das Alginat ist frei von Zusatzstoffen, wie z. B. Immunsuppressiva oder immunstimulierenden Substanzen oder Phenolen oder Phenol-ähnlichen Verbindungen, und kann in diesem Zustand unmittelbar angewendet werden.

Die Verfahrensschritte können ohne Probleme in verhältnismäßig kleinem Maßstab, z.B. am Ort der Algernernte, oder auch großtechnisch durchgeführt werden. Durch gezielte Steuerung der Fällungsreaktion werden Verunreinigungen durch Fucoidan ausgeschlossen, so daß sich die Reinheit des gewonnenen Alginats im Vergleich mit herkömmlichen Alginaten verbessert.

Die unmittelbare Verarbeitung von Algenmaterial besitzt eine Reihe von Vorteilen. Erstens werden Nachteile bei der herkömmlichen Algernernte, die sich durch Zersetzung und Verrottung am Ernteort und die konservierende Chemikalienbehandlung ergeben, vollständig vermeidbar. Zweitens lassen sich die geernteten Algen nach Organen oder Gewebeabschnitten trennen, bevor die Alginatgewinnung durchgeführt wird. Da sich die verschiedenen Algengewebe durch verschiedene Verhältnisse der

monomeren Mannuronsäure und Guluronsäure unterscheiden, können gezielt hochgereinigte Alginate mit einer bestimmten Mannuron-Guluron-Zusammensetzung hergestellt werden. Entsprechendes gilt für die Wahl bestimmter Gewebeteile zur Erziehung eines bestimmten Molekulargewichts. Es lassen sich erfundungsgemäß Alginatzusammensetzungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1.000 kD gewinnen. Schließlich kommt das erfundungsgemäß Verfahren ohne aufwendige Zentrifugations schritte aus, wodurch die praktische Implementierung weiter vereinfacht wird. Die gezielte Gewinnung verschiedener Sorten hochreinen Alginats (z.B. guluronat- bzw. mannuronatreiches Alginat) lässt sich auch durch gezielte Gewinnung aus bestimmten Algenspezies (*Laminariales*, *Ectocarpales*, *Fucales* und anderen Alginat enthaltenden Algenspezies) realisieren, die sich durch die chemische Struktur des jeweiligen Alginats unterscheiden. Bei der organspezifischen Selektion werden hingegen Phylloide, Cauloide und Rhizoide der Algen getrennt und separat verarbeitet. Diese Differenzierung kann weiter verfeinert werden, in dem einzelne Gewebe der verschiedenen Organe getrennt und das Alginat aus diesen Geweben separat gewonnen wird.

Die Erfahrung ist insbesondere zur Alginatgewinnung aus frischem oder getrockneten Algenmaterial (insbesondere Braunalgen) angepaßt. Es ist jedoch auch möglich, mit dem erfundungsgemäß Verfahren kommerziell verfügbare Rohalginate zu reinigen oder das erfundungsgemäß Verfahren mit bestimmten Wasch- oder Trennschritten (z.B. Zentrifugation) zu kombinieren, die aus den herkömmlichen Reinigungsverfahren bekannt sind.

Vorteile der Erfahrung ergeben sich auch daraus, daß das hochreine Alginat unmittelbar aus den Algenpflanzen unter Kontrolle sämtlicher Prozeßschritte gewonnen wird. Es werden toxische Chemikalien (insbesondere Lösungsmittel) vermieden,

so daß ein Einsatz für pharmazeutische Zwecke ohne weiteres möglich ist. Das Aufschäumen des ausgefällten Alginats stellt ein besonders einfaches und energiearmes Abtrennverfahren dar.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die folgenden Verfahrensschritte zunächst an Algenfrischmaterial oder getrocknetem Material durchgeführt und anschließend an hochgereinigtem Alginat teilweise wiederholt, das beim ersten oder früheren Verfahrensabläufen gewonnen wurde. Das Algenmaterial bzw. kommerzielle Alginat wird im folgenden als Ausgangsmaterial bezeichnet.

Erfindungsgemäß wird das Ausgangsmaterial zunächst in Gegenwart von Komplexbildnern, ggf. in einer Sodalösung (siehe unten, Beispiel 1), extrahiert. Anschließend werden in der Lösung vorhandene Zellbestandteile und Partikel durch Zugabe eines Granulats und falls erforderlich durch Zugabe von Ionenaustauschern (wie z.B. Amberlit) zur Sedimentation gebracht und die Lösung anschließend gefiltert. Die Sedimentation kann alternativ unter Verwendung von Elektrographit (z.B. in Kügelchen-Form) vorgenommen werden. Dabei wird Elektrographit in die Lösung eingerührt und durch einen Stromfluß zwischen zwei in die Lösung eingehängten Elektroden aufgelaaden. Die geladenen Elektrographitkügelchen zeigen eine Akkumulation von Verunreinigungen, die hier die betreffenden Zellbestandteile und Fremdpartikel umfassen. Die Sedimentation wird vorzugsweise bei der Reinigung kommerziellen Alginatmaterials eingesetzt, kann aber anwendungsabhängig auch ganz wegfallen (siehe unten, Beispiel 2). Der Filterschritt kann eine mehrfache Filterung mit schrittweise sich verringender Porengröße z.B. von 15 µm bis 0.1 µm umfassen. Aus der gefilterten Lösung wird das Alginat durch ein geeignetes Fällungsmittel ausgefällt. Die Fällung wird vorzugsweise mit einem Alkohol (z.B. Ethanol) durchgeführt. Es kann aber auch

eine Säure oder ein anderes geeignetes Fällungsmittel verwendet werden. Die Alkoholkonzentration wird im Bereich zwischen 10% bis 50%, vorzugsweise im Bereich von 30% bis rd. 50% gewählt. In diesem Konzentrationsbereich bleiben Verunreinigungen durch immunologisch aktive Polysaccharide wie z.B. Fucoi-dan in der Lösung und können somit vom Alginat getrennt werden. Falls höhere Alkoholkonzentrationen wie z.B. beim Verfahren nach De Vos et al. verwendet werden, so können diese unerwünschten Polysaccharide nicht abgetrennt werden. Während der Ausfällung erfolgt vorzugsweise eine Durchströmung der Lösung mit einem Treibgas (z.B. Luft). Das ausgefällte Alginat wird durch die eingeblasene Luft nach oben aufgetrieben und kann von der Lösungsoberfläche leicht mit einer geeigneten Einrichtung (z.B. Netz, Sieb oder dergl.) von der Lösung abgetrennt werden. Anschließend wird das gesammelte Alginat mit einer Filterpresse entwässert.

Die genannten Verfahrensschritte werden anwendungsabhängig ganz, teilweise oder in teilweise modifizierter Form wiederholt. Nach dem letzten Verfahrensablauf wird das hochgereinigte Alginat in Ethanol und ggf. anschließend in Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Das gereinigte Alginat besitzt in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial ein Verhältnis der Monomeren Mannuronsäure und Guluronsäure im Bereich von 0.1 - 9 (entsprechend 1% bis 90% Mannuronsäure) und ein mittleres Molekulargewicht von ca. 10 kD bis mehr als 1000 kD. Derart gereinigtes, bei einer autoimmundiabetischen BB/OK Ratte implantiertes Alginat löst nach einer Implantationszeit von 3 Wochen keine oder nur eine sehr schwache Fremdkörperreaktion aus, wie im einzelnen unten erläutert wird.

Das beschriebene Verfahren zur Alginatgewinnung kann in Bezug auf das Fällungsmittel, die Wahl des Sedimentationsmittels,

die Wahl des inerten Treibgases, das Fällungsverfahren und/oder das Vorgehen beim Einsammeln des ausgefällten Alginats modifiziert werden. Anstelle des zur Sedimentation eingesetzten Kieselgur kann auch jedes andere absorbierende Material wie Elektrographite, Granulate, Cellulose, poröse Recycling-Materialien in Pulver- oder Partikelform verwendet werden. Es ist auch möglich, zur Sedimentation ein mit einem absorbierenden Material beschichtetes Rührwerkzeug zu verwenden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein hochgereinigtes Alginat, das als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure in einem Verhältnis im Bereich von 1% bis 90%, insbesondere rd. 70%, besteht, wobei das mittlere Molekulargewicht größer als 1000 kD, mindestens jedoch größer als 250 kD, ist.

Erfindungsgemäße Alginate zeichnen sich aufgrund ihrer extremen Reinheit und aufgrund der schonenden Extraktion beim erfindungsgemäßen Verfahren durch charakteristische Stoffeigenschaften aus, die bei herkömmlichen Alginate nicht gegeben sind. Diese Stoffeigenschaften umfassen sowohl charakteristische Parameter, die als Eigenschaften des Alginats direkt meßbar sind (z.B. Viskosität), als auch Parameter, die als Eigenschaften der erfindungsgemäß entfernten Verunreinigungen, deren vollständiges Fehlen oder vernachlässigbar geringes Auftreten auf die hohe Reinheit des erfindungsgemäßen Alginats hinweisen (z.B. Fluoreszenzeigenschaften von Verunreinigungen, Auslösung immunologischer Reaktionen bei Tierversuchen und in Zellkulturen etc.)

Ein erfindungsgemäßes Alginat zeichnet sich durch eine hohe Viskosität aus. Eine wässrige Lösung eines erfindungsgemäßen Alginats mit einer 0.1-%igen Konzentration besitzt eine Viskosität im Bereich von 10 bis 15 mPa s. Dies stellt einen erheblich höheren Wert gegenüber der Viskosität herkömmlicher

Alginatlösungen gleicher Konzentration (rd. 1 bis 5 mPa s) dar. Bei 0.5%igen Lösungen erfindungsgemäßer Alginate ergibt sich eine Viskosität von 280 mPa s. Die Viskosität der Alginatlösungen werden mit einem Kugelrollviskosimeter (Typ: AMV-200, Anton Paar KG, Graz, Österreich) bestimmt. Aus den Viskositätswerten wird mittels der Verfahren nach Huggins ("J. Am. Chem. Soc.", Bd. 64, 1942, S. 2716 ff.) und Krämer ("Ind. Eng. Chem.", Bd. 30, 1938, S. 1200 ff.) das Molekulargewicht bestimmt. Es ergeben sich bei den erfindungsgemäßen Alginaten mittlere Molekulargewichte größer als 250 kD.

Erfindungsgemäße Alginate sind frei von Phenolen und phenolähnlichen Verbindungen, insbesondere von Polyphenolen, die sich aus Phloroglucinol zusammensetzen, und Phenol-Protein-Verbindungen. Bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm besitzen erfindungsgemäße Alginate, abgesehen von einer Lösungsmittelfluoreszenz (Raman-Bande des Wassers) bei 418 nm im Spektralbereich von 380 bis 550 nm keine Fluoreszenzemissionen. Die Phenol- und Polyphenol-Freiheit erfindungsgemäßer Alginate ergibt sich auch aus Farbtests unter Verwendung der Folin-Denis-Reaganz oder mit Dimethoxybenzaldehyd (DMBA). Erfindungsgemäße Alginate besitzen bei diesen Farbtests, abgesehen von der Lösungsmittelabsorption, keine Extinktion.

Erfindungsgemäße Alginate sind praktisch frei von Substanzen (z.B. Proteinen), die bei einer Wellenlänge von 350 nm absorbieren. Die Proteinfreiheit zeigt sich wiederum bei einer Fluoreszenzmessung mit einer Anregungswellenlänge von 270 nm, die, abgesehen von der Lösungsmittelfluoreszenz, im Spektralbereich von 300 bis 500 nm keine Fluoreszenzemission ergibt. Die Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginate wird auch mit dem photometrischen Proteinnachweis nach Bradford ("Anal. Biochem.", Bd. 72, 1976, S. 248 ff.) gezeigt.

Erfindungsgemäße Alginate sind auch Endotoxin-frei. Endotoxine sind Verunreinigungen, die bei einer Implantation einer Immunreaktionreaktion des Empfängers auslösen können, welche aus den Zellenwänden der bakteriellen Begleitflora der Alginate in herkömmliche Algenextrakte gelangen. Erfindungsgemäße Alginatlösungen (Konzentration: 0,25%) besitzen einen Endotoxingehalt von weniger als 14,5 Endotoxineinheiten pro Milliliter Alginatlösung (Meßverfahren: quantitative Endotoxinbestimmung mit Limulus Amöbozyten Lysat-Test).

Erfindungsgemäße Alginate sind im Gegensatz zu herkömmlichen Alginatextrakten biokompatibel, soweit dies durch die unten erläuterten XTT- und MTT-Tests und Versuche an BB/OK-Ratten gezeigt wird.

Bevorzugte Anwendungen eines derartigen, hochgereinigten Alginate sind die Transplantationschirurgie, bei der lebende Zellen in einer Alginatkapsel eingeschlossen und ohne die Auslösung immunologischer Reaktionen im Körper eines Lebewesens implantiert werden. Das hochgereinigte Alginat kann auch in den Gebieten der Lebensmittel- oder Textiltechnik zur Erhöhung der Verträglichkeit bestimmter Nahrungsmittel oder Stoffe eingesetzt werden. Es wird betont, daß das oben erläuterte erfundungsgemäße Verfahren auch zur Herstellung hochgereinigten Alginate mit geringerem Molekulargewicht bis zu 1000 kD geeignet ist.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im folgenden, insbesondere unter Bezug auf die beigefügten Figuren beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 eine Schnittansicht eines Düsenkopfes zur Herstellung von Alginatkapseln,

Fig. 2 Fluoreszenzspektren zur Demonstration der Phenolfreiheit erfindungsgemäßer Alginate,

Fig. 3 Fluoreszenzspektren zur Demonstration der Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginate, und

Fig. 4 Ergebnisse eines Lymphozytenstimulationstests zur Demonstration der Immunogenfreiheit erfindungsgemäßer Alginate.

Ausführungsbeispiele

Im folgenden werden konkrete Ausgestaltungen der oben allgemein erläuterten Verfahrensweise an Beispielen beschrieben. Dabei wird ohne Beschränkung auf die Reinigung bzw. Verwendung von Alginatmaterial auf der Basis von Braunalgen Bezug genommen. Anstelle von Braunalgen können allgemein alle alginatenthaltenden Salzwasser- oder Süßwasser-Algen verwendet werden. Die Reinigung von Alginatmaterial aus anderen Algen erfolgt in entsprechender Weise.

Das Ausgangsmaterial umfaßt (1) frische Braunalgen, (2) getrocknete Braunalgen oder (3) kommerzielles Alginat. Als Frischmaterial (1) werden in der Natur oder in einem Kultivierungsraum oder Gewächshaus geerntete Braunalgen oder Braunalgenteile aus vorbestimmten Entwicklungsstadien des Lebenszyklus der Algen oder entsprechendes in einem homogenen Bioreaktor kultiviertes Algenmaterial verwendet. Das Trockenmaterial (2) besteht aus getrockneten Braunalgen, die entsprechend diesen Alternativen gewonnen wurden.

Beispiel 1

Beim ersten Beispiel wird auf 80 g trockene und anschließend wieder hydratisierte (gewässerte) Algen Bezug genommen. Bei kommerziellem Alginat, dessen Trockengewicht nur rund 1% des Frischgewichts ausmacht, wird entsprechend weniger Trockengewicht eingesetzt. Das trockene Material (z.B. *Laminariales*, *Fucales*) gemäß (2) oder (3) wird je nach Ausgangsmenge für mehrere Stunden in warmem Leitungswasser gewässert. Dies kann beispielsweise bei Leitungswasser mit einer Temperatur von 40°C mindestens 3 bis 4 Stunden dauern, wobei das Wasser mehrfach ausgetauscht wird oder fließt. Bei Verwendung von kälterem Wasser muß die Wässerung entsprechend verlängert werden. Die Wässerung erfolgt vorzugsweise dadurch, daß das Material in einem wasserdurchlässigen Behältnis (z.B. wasserdurchlässiger Sack) in fließendes Leitungswasser gehängt wird. Bei Wässerung in stehendem Wasser wird das Material z.B. bei einem Ausgangstrockengewicht von rund 80 g getrockneter Algen (entsprechend 10% des Frischgewichts von rund 800 g) in 3 bis 6 l Wasser gewässert. Nach der Wässerung erfolgt die Verfahrensweise für alle drei genannten Arten von Ausgangsmaterial (1) bis (3) analog.

Das Material wird in rund 5.7 l einer 25 mM EDTA-Lösung (Aqua dest. bzw. demineralisiertes Wasser) suspendiert (bzw. im Falle von kommerziellem Alginat (3) gelöst). Die Einwirkung der Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Lösung erfolgt mindestens 10 Stunden. Die Einwirkungszeit kann verkürzt werden, wenn die Suspension laufend gerührt wird. Mit steigender Einwirkungszeit verbessert sich die Ausbeute an gereinigtem Alginat. Bei einer ungerührten Suspension kann beispielsweise eine Einwirkungszeit von mehreren Tagen vorgesehen sein.

Anschließend werden 5% Na₂CO₃ und EDTA als Festsubstanzen unter Röhren zugegeben. Die EDTA-Menge wird derart gewählt, daß eine 50 mM-EDTA-Lösung gebildet wird. Die Suspension wird so lange gerührt, bis eine homogene (feindisperse) Lösung vorliegt. Dieser Zustand ist insbesondere dann erreicht, wenn in der Lösung nur noch wenige Zellbestandteile sichtbar sind. Anschließend werden rund 34 g Kieselgur unter Röhren zugesetzt und die Lösung für mindestens 2 Tage gerührt. Es ist alternativ möglich, das Kieselgur zusammen mit Na₂CO₃ und EDTA unter Röhren zuzugeben. Es kann anwendungsabhängig (insbesondere in Abhängigkeit vom verwendeten Braunalgenmaterial) vorgesehen sein, zusätzlich Ionenaustauschermaterial gleichzeitig mit dem Kieselgur oder Elektrographit zuzugeben. Es ist beispielsweise möglich, zusätzlich 34.2 g Amberlit als Ionenaustauscher zuzusetzen, das vorher einer Reinigung unterzogen worden ist. Diese Reinigung dient der Entfernung toxischer Substanzen und umfaßt eine Wässerung in fließendem Wasser (Dauer rund 3 Stunden).

Nach der Kieselgurbehandlung wird das Volumen der Lösung mit demineralisiertem Wasser auf 22.8 l verdünnt, um die Viskosität zu verringern. Die Verdünnung wird allgemein derart gewählt, daß die Lösung anschließend filtrierbar ist. Der Wasserzusatz hängt somit insbesondere auch vom verwendeten Braunalgenmaterial ab. Nach der Verdünnung und kurzzeitigem Durchrühren wird die Lösung für mindestens 10 Stunden stehen gelassen, um feste Bestandteile sedimentieren zu lassen. Die Standzeit kann auch im Bereich von Tagen liegen. Der Überstand wird abdekantiert und filtriert. Die Filtration erfolgt mehrstufig, wobei erst ein Tiefenfilter mit einer Porengröße von 15 µm und anschließend ein Filter mit einer Porengröße von 0.1 µm verwendet wird.

Anschließend folgt ein Salzzusatz zu dem Filtrat. Es wird der Zusatz von KCl bevorzugt, wobei anwendungsabhängig auch andere, entsprechende Salze eingesetzt werden können. Es wird soviel KCl als Festsubstanz zugegeben, daß sich eine 0.13 M KCl-Lösung ergibt.

Anschließend folgt eine Ethanol-Fällung. Die Menge des Ethanolzusatzes hängt davon ab, wieviel Fucoidan sich im Material befindet. Bei der ersten Ethanolfällung sollte die Ethanolendkonzentration bei Anwesenheit von Fucoidan nicht 40% überschreiten, da sonst das Fucoidan mit ausfällt. Beim angegebenen Beispiel werden rund 12 l 99%iger Ethanol zugesetzt, so daß die Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung bei rund 34% liegt. Es kann auch vorgesehen sein, daß die Ethanolkonzentration in Abhängigkeit von der Art des Ausfalls des Alginats gewählt wird. Durch Variation der Ethanolkonzentration kann erzielt werden, daß das Alginat fadenförmig oder watteförmig ausfällt. Eine derartige Ausfällung wird nach Möglichkeit angestrebt, damit das Alginat aufschwimmt bzw. weiterverarbeitet werden kann, wie dies unten erläutert wird.

Anstelle von Ethanol kann auch mindestens ein anderer Alkohol (z. B. Isopropanol) oder eine Fällungssäure zugegeben werden, wobei die Konzentration sich nach den genannten Kriterien richtet.

Während der Fällung erfolgt eine Durchströmung der Lösung mit einem Treibgas (z.B. Luft). Das ausgefällte Alginat wird während der Fällung, d.h. im Entstehen, durch die eingekochte Luft nach oben aufgetrieben und kann von der Lösungsoberfläche leicht mit einer geeigneten Einrichtung (z.B. Netz, Sieb, oder dgl.) von der Lösung abgehoben werden. Das ausgefällte Alginat kann auch ohne Treibgaszusatz durch Dekantieren oder Umrühren mit einer Röhreinrichtung, an der ausgefälltes Algi-

nat haften bleibt, gesammelt werden. Anschließend wird das gesammelte Alginat mit einer Filterpresse entwässert, um dem stark hygrokopischen Material zumindest teilweise Wasser zu entziehen.

Die bis hier realisierten Verfahrensschritte werden anwendungsabhängig ganz, teilweise oder teilweise unter modifizierten Bedingungen wiederholt. Danach wird eine Weiterverarbeitung des gefällten Alginats wie folgt durchgeführt.

Das gefällte Alginat wird in 11.4 l und 0.5 M-KCl/10 mM-EDTA-Lösung aufgelöst. Die Auflösung erfolgt unter Rühren, bis eine homogene Lösung vorliegt. Anschließend folgt eine zweite Fällung mit rund 10 l einer 99%igen Ethanollösung unter Treibgaszuführung. Unter diesen Bedingungen beträgt die Alkoholkonzentration in der Gesamtlösung rund 44%. Bei dieser zweiten Fällung kann eine höhere Alkohol-(bzw. Säure-)Konzentration gewählt werden, da das Fucoidan (siehe oben) bereits abgetrennt ist. Allerdings wird die Konzentration des Fällungsmittels wiederum so eingestellt, daß die Bildung von faden- oder watteartigem Alginat gefördert wird. Bei nicht-optimaler Alkoholkonzentration ist das Alginat gelatineartig und kann somit nicht flotiert werden (Aufschwimmen unter Treibgaswirkung).

Anschließend wird das gefällte Alginat wieder durch eine Filterpresse entwässert und mehrmals mit der 10-fachen Menge einer 70%igen Ethanollösung gewaschen. Anschließend wird das Material bei Raumtemperatur getrocknet. Die Trocknung kann anwendungsabhängig unter sterilen Bedingungen erfolgen. Es kann nach der Waschung mit Ethanol vorgesehen sein, das Material mehrfach mit demineralisiertem Wasser zu waschen oder gegen demineralisiertes Wasser zu dialysieren, um Restspuren von Begleitstoffen zu entfernen.

Die Zahl der erfindungsgemäß durchgeführten Fällungen richtet sich nach den Verunreinigungen bzw. den toxischen Beiprodukten im Ausgangsmaterial.

Die Gewebeverträglichkeit des entsprechend dem Beispiel gewonnenen Alginats wird wie folgt geprüft. Es werden Implantationsexperimente mit normoglykämischen (6.1 + 0.4 mM Plasmaglucose), diabetisanfälligen BB/OK-Ratten (200 + 25 Tage alt) durchgeführt. Diese Ratten besitzen eine erheblich höhere Empfindlichkeit gegen Verunreinigungen in Alginaten als die oben genannten Lewisratten.

Ba²⁺-Alginatkapseln wurden aus dem hochgereinigten Alginat entsprechend der Verfahrensweise hergestellt, die in DE-OS 42 04 012 A1 beschrieben ist. Die Alginatkapseln besitzen einen mittleren Durchmesser von 200 µm bis 400 µm. Die Implantation erfolgte unter die Nierenkapsel der BB/OK-Ratten. Die Empfängertiere blieben normoglykämisch und zeigten keinen Verlust an Körpergewicht. Nach drei Wochen wurden die Tiere getötet, die Nieren herausgenommen und in Bouin'scher Lösung fixiert. Nach Einbettung in Paraffin folgte die Präparation von 7 µm-Schnitten. Jeder 20. Schnitt von zwei unabhängigen Individuen wurde zur histologischen Untersuchung herangezogen.

Das Ergebnis der Untersuchung für verschiedene Proben im Vergleich mit Rohalginat ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Resultat für zwei unabhängige Proben:

Probe	Ratte #	Histologische Beurteilung (Fibrose)	Endotoxingehalt einer 0,25%igen Lösung des Alginats
S1	V159	(+)	1 EU/ml
	V161	+	
S2	V454	0	3,5 EU/ml
Rohalginat	V12	++++	> 1000 EU/ml

(Legende:

0: keine Reaktion, (+): sehr schwache Reaktion, +: schwache Reaktion,
++++: sehr starke Fibrose)

Es zeigt sich, daß die Implantation mit erfindungsgemäßem Alginat keine oder nur eine sehr schwache Reaktion auslöst, wohingegen bei Implantation mit kommerziell angebotenem Rohalginat eine sehr starke Fibrose auftritt.

Der Endotoxingehalt, der charakteristisch für einen potentiellen Bakterienbefall ist, zeigt im Falle der hochgereinigten Alginate hervorragende, nahezu vernachlässigbare Werte, wohingegen der Vergleichswert des kommerziellen Rohalginats rd. tausendfach größer ist.

Am erfindungsgemäß hergestellten, hochgereinigten Alginat wurde auch unter Anwendung der folgenden Testverfahren festgestellt, daß keine Verunreinigungen von toxischen Substanzen gegeben ist. Die Testverfahren umfassen insbesondere fluoreszenzspektroskopische Verfahren und Endotoxin- oder Mitogenaktivitäts-Essays, wie sie von G. Klöck et al. in "Appl. Microbiol. Biotechnology" (Band 40, 1994, Seite 638 ff) und in "Biomaterials" (Band 18, 1997, Seite 707) beschrieben sind, NMR-spektroskopische Verfahren, die Bestimmung des antioxidativen Potentials des hochgereinigten Alginats durch Ermittlung der Reaktion auf Zugabe von HOCl und über die Bestimmung der oxidativen Aktivität neutrophiler Granulocyten unter Zuhilfenahme der Chemolumineszenz (siehe K. Arnold in "Abhandlungen der sächsischen Akademie der Wissenschaften zu

Leipzig", Band 58, 1997, Heft 5) und das Verfahren der "Free Flow Electrophoresis" wie es von U. Zimmermann et al. in "Electrophoresis" (Band 13, 1992, Seite 269) beschrieben ist. Eine toxische Verunreinigung wurde mit diesen Verfahren nicht bestimmt.

Nach den in der oben genannten Publikation von G. Klöck et al. (1997) angegebenen Verfahren wurde ferner das Verhältnis von Mannuron- zu Guluronsäure mit Hilfe der sogenannten "Circular Dichroismus-Spectroscopy" bzw. mit der IR-Spektroskopie ermittelt. Ferner wurde auch das Molekulargewicht über die Bestimmung der Viskosität ermittelt.

Die mit Ba^{2+} vernetzten Kapseln aus Alginat besitzen eine hervorragende Elastizität, wie es mit Hilfe von Kompressionsmessungen nachgewiesen werden konnte.

Beispiel 2

Beim zweiten Beispiel wird auf 10 g trockene Algen Bezug genommen. Bei größeren Ausgangsmassen sind die im folgenden gegebenen quantitativen Größen entsprechend linear umzurechnen. Im Unterschied zu Beispiel 1 erfolgt die Alginatgewinnung bzw. -reinigung vorteilhafterweise ohne eine Wässerung oder Quellung. Das trockene Ausgangsmaterial wird vielmehr unmittelbar in eine EDTA-Lösung gegeben. Die EDTA-Lösung besitzt eine Konzentration im Bereich von rd. 10 bis 50 mM. Die Suspension wird 24 Stunden gerührt und anschließend zur Entfernung von Festmaterial gesiebt. Ein weiterer Vorteil der beim zweiten Beispiel erläuterten Verfahrensweise besteht darin, daß der EDTA-Verbrauch und auch der Alkoholeinsatz verringert wird.

Es kann vorgesehen sein, daß der Suspension während der EDTA-Behandlung zusätzlich Aktivkohle zugesetzt wird. Die Masse

der zugesetzten Aktivkohle beträgt vorzugsweise etwa 10 bis 200 % der eingewogenen Algentrockenmasse.

Anschließend erfolgt unmittelbar ohne einen gesonderten Sedimentationsschritt eine Filtration der Suspension. Die Filtration erfolgt zweistufig, wobei erst ein Vor- oder Tiefenfilter mit einer Porengröße von 15 µm und anschließend ein Filter mit einer Porengröße von 0.2 µm verwendet wird.

Nach einem Salzzusatz zu dem Filtrat wie bei Beispiel 1 (z. B. Bildung einer 0.13 M KCl-Lösung) folgen mehrere Ethanol-Fällungen. Für die erste Fällung wird 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zugesetzt, so daß sich eine Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 37.5% ergibt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und in eine 0.5M KCl-Lösung (ohne EDTA) gegeben. Das Volumen der KCl-Lösung wird auf ein Drittel des Lösungsvolumens vor der Fällung eingestellt.

Für die zweite Fällung wird wiederum 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zugesetzt, so daß sich hier eine Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 44% ergibt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und in bidestilliertes Wasser mit einem Volumen entsprechend dem Volumen der KCl-Lösung nach der ersten Fällung gegeben.

Vor der dritten Fällung kann eine Dialyse des bei der zweiten Fällung gewonnenen Fällungsprodukts durchgeführt werden. Die Dialyse, die kein zwingendes Verfahrensmerkmal ist, erfolgt für die Dauer von 3 Tagen mit 3 Wasserwechseln pro Tag. Für die dritte Fällung wird wiederum 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zur Einstellung einer Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 50% zugesetzt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und getrocknet.

Beispiel 3

Im folgenden wird ein Beispiel zur Transplantationschirurgie, nämlich die Mikrokapsulierung Langerhans'scher Inseln, beschrieben.

Isolierte Langerhans'sche Inseln wurden in einer Lösung von 0.9% NaCl und 0.5% des gereinigten Alginats suspendiert. Diese Suspension wurde durch eine in Fig. 1 gezeigte Sprühdüse 10 fein zertropft. Die Düse hat ein bewegliches inneres Hohlrohr 20 (innere Düse) mit Lüranschluß (innerer Durchmesser 350 µm bzw. 2 mm), ein mittleres Hohlrohr 30 (mittlere Düse) mit einem Durchmesser von 1 mm bzw. 3.5 mm und einen äußeren Kanal 40, der in einem justierbaren Luftfokussierkopf 50 mündet. Diese Elemente wurden an einem Düsenkopf 60 montiert, an dem sich Druckluft- und Lüranschluß befinden.

Die Inselsuspension in Alginat wird durch den zentralen Düsenkanal gedrückt. Durch den umgebenden Kanal wird eine Lösung von 0.5 bis 2% des Alginats in 0.9% Kochsalzlösung appliziert. Bei den am Düsenausgang entstehenden Tropfen umschließt auf diese Weise die äußere Alginatlösung (0.5 bis 2%) die in der 0.5%igen Alginatlösung suspendierten Inseln. Durch den äußeren, dritten Kanal wird Druckluft zugeführt, welche die Tropfen von der Düsenöffnung abschert. Die Druckluft wurde auf 30 bis 40 mbar (7 bis 8 l/min) eingestellt. Die Alginattropfen 70 wurden in 40 mL Vernetzerlösung mit 20 mM BaCl₂ und 5 mM Histidin geliert. Die Vernetzerlösung ist mit NaCl auf eine physiologische Konzentration (290 mOsmol) eingestellt. Die Kapseln wurden dann dreimal entsprechend mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen.

Mit dem erfindungsgemäßen Alginat können allgemein Umhüllungen für allogene und xenogene Gewebe, insbesondere endokrines Gewebe, hergestellt werden.

Weitere Charakterisierung erfundungsgemäßen Alginatmaterials

1. Fluorimetrischer Phenolnachweis

Erfundungsgemäße Alginate enthalten keine störenden Verunreinigungen auf der Basis von Phenolen, Polyphenolen und anderen Phenolverbindungen. Diese Phenolfreiheit bedeutet, daß die genannten Verunreinigungen nicht oder in einem derart geringen Gehalt in den Alginaten enthalten sind, daß Anwendungen in der Biologie und Medizin, insbesondere die obengenannten Anwendungen, nicht durch Immunreaktionen oder dergleichen gestört werden. Die Phenolfreiheit wird mit einer fluorimetrischen Analyse nachgewiesen, die von G. Skajk-Braek et al. (s. "Biotechnology and Bioengineering", Bd. 33, 1989, S. 90 ff.) beschrieben worden ist. Die Fluoreszenzmessung wird mit einem Spektrometer LS50 (Perkin-Elmer, Beaconsfield) durchgeführt. Bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm ergeben sich die in Fig. 2 gezeigten Fluoresenzspektren an Lösungsproben während der Reinigung gemäß Beispiel 2. Vor und nach der anfänglichen Filtration zeigt die Alginatlösung eine starke Fluoreszenz im Bereich zwischen 380 und 550 nm (obere Spektren). Nach den Filtrations- und Fällungsschritten ist die Fluoreszenz erheblich vermindert. Die Konzentration der Endlösung beträgt rd. 0,2-0,3%. Es verbleibt lediglich ein Fluoreszenzmaximum bei 418 nm, was der Lösungsmittelfluoreszenz entspricht. Im erfundungsgemäß gereinigten Alginat ist die Fluoreszenz der Phenole und Phenolverbindungen auf weniger als rd. 10% gegenüber der ungereinigten Alginatlösung reduziert.

Fig. 2 zeigt, daß die Phenolgehalte im Laufe des erfundungsgemäß Verfahrens drastisch abnehmen und daß das gereinigte Alginat eine Emission zeigt, die nur noch geringfügig über den Werten hochreinen Wassers liegt.

2. Fluorimetrischer Proteinnachweis

Die Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginate wird wie bei der Analyse gemäß 1. fluorimetrisch nachgewiesen. Fig. 3 zeigt, daß bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm vor der Reinigung eine starke Emission im Bereich von 300 bis 500 nm gemessen wird. Diese Emission fällt im Laufe der Reinigung auf einen Wert unterhalb von 20% der Fluoreszenz der ungereinigten Alginatlösung ab. Nach der letzten Fällung ist die Fluoreszenz nicht mehr nachweisbar oder vernachlässigbar klein.

3. Phenolnachweis nach Folin-Denis bzw. mit DMBA

Der Folien-Denis-Nachweis färbt sämtliche phenolhaltige Verbindungen. Erfindungsgemäß hergestellte Alginate zeigen bei diesem Nachweise keine Extinktion. Der Folin-Denis-Nachweis wird unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Die zu analysierende Alginatlösung (0,5 ml) wird mit 1 ml Methanol zur Extraktion versetzt. Die Probe wird nach intensivem Schütteln für ca. 8h in den Kühlschrank gestellt. Das ausgefallene Alginat wird abzentrifugiert, 10 µl des Überstandes werden in 40 µl des Folin-Denis Reagenz (Fluka, Deisenhofen, Deutschland), 80 µl 1 M Na₂CO₃ und 120 µl H₂O (Reihenfolge einhalten) gegeben. Nach intensivem Schütteln erfolgt die Farbentwicklung im Wasserbad bei 50°C für 30 min. Es folgt die Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 650 nm (oder 725 nm).

Auch beim Zusatz von Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) zeigen die erfindungsgemäßen Alginate keine photometrisch auswertbare Farbreaktion. Dieser Test wurde unter den folgenden Bedingungen ausgeführt: Die zu analysierende Alginatlösung (0,5 ml) wird mit 1 ml Methanol zur Extraktion versetzt. Die Probe wird nach intensivem Schütteln für ca. 8h in den Kühlschrank

gestellt. Das ausgefallene Alginat wird abzentrifugiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 µl des Überstandes in die DMBA Lösung, die wie folgt hergestellt wurde: 2 g DMBA (Fluka, Deisenhofen, Deutschland) werden in 100 ml Eisessig gelöst. 16 ml HCl (37%) werden mit Eisessig auf 100 ml aufgefüllt. Beide Lösungen sind kurz vor der Verwendung 1:1 zum Arbeitsreagenz zu mischen.

Es folgt die Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 490 nm (oder 510 nm) gegen eine Eichreihe Phloroglucinol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

4. Proteinnachweis nach Bradford

Der Proteinnachweis nach Bradford (s. "Anal. Biochem.", Bd. 72, 1976, S. 248 ff.) basiert auf der Tatsache, daß der Farbstoff Coomassie brilliant blue sehr spezifisch an Proteine anbindet, wodurch es zu einem Farbumschlag von rot nach blau kommt. Die Intensität der Blaufärbung korreliert linear mit der Proteinmenge und kann photometrisch quantifiziert werden. Mit dieser Methode sind Proteine bis in den unteren µg-Bereich nachweisbar. Es wurden 10 µl einer 0,5%igen Alginatlösung untersucht. Als farbstoffhaltige Nachweissubstanz wurde das sogenannte Bradford-Reaganz (Hersteller Sigma, Steinheim, Deutschland) der Alginatlösung zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Probenabsorption photometrisch bei 570 nm unter Verwendung eines "Thermomex Microplate Reader"-Gerätes (Hersteller Molecular Devices, Manlow Park, USA) gemessen. In der erfindungsgemäßen Alginatlösung wurden mit diesen Verfahren keine Proteine gefunden.

5. XTT- und MTT-Tests

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginate kann mit den folgenden Tests gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Maus-Lymphozyten oder Fibroblasten werden für einige Tage mit den Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginate eine immunogene Wirkung auf, so werden die Zellen stimuliert oder inhibiert (um den Effekt der Stimulation zu verdeutlichen können zusätzliche Stimulanzen, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Die bei Lymphozyten erhöhte und bei Fibroblasten verminderte Stoffwechselaktivität kann anhand der Umsetzung eines Farbstoffs (XTT oder MTT) durch mitochondrielle Dehydrogenasen visualisiert und photometrisch quantifiziert werden. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginaten ist die Farbstoffumsetzung vernachlässigbar gering (s. Fig. 4), wohingegen bei kommerziellen Alginaten eine starke Farbstoffumsetzung nachweisbar ist. Fig. 4 zeigt die Ergebnisse der Farbtests für verschiedene LPS-Vorstimulierungen.

Die Kultivierung der Zellen wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Lymphozytenzelluspension (1×10^6 Zellen/ml in Complete Growth Medium) wird mit verschiedenen Konzentrationen an Lipopolysacchariden (LPS, Endkonzentration: 0,01 µg/ml) und Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) versetzt und 3 Tage bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Danach wird die Suspension mit einer Lösung des Tetrazoliumsalzes (XTT oder MTT) und für weitere 6h inkubiert. Es folgt die Messung der optischen Dichte bei 450 nm (Referenzmessung bei 650 nm).

6. Versuche in BB/OK-Ratten

Wie oben bei Beispiel 1 beschrieben, kann die Biokompatibilität erfindungsgemäßer Alginate auch durch in vivo-Tests an BB/OK-Ratten gezeigt werden, deren Immunsystem eine erhöhte Makrophagenaktivität aufweist. Erfindungsgemäß gereinigtes

Alginat, das entsprechend den oben beschriebenen Schritten kapselförmig in Ratten-Nieren implantiert worden ist, verursacht nach 3 Wochen Inkubationszeit keine Fibrosen.

7. Elektrorotation

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginat kann auch mit folgendem Test gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Human-Lymphozyten oder Maus-Lymphozyten werden für einige Tage mit Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginat eine immunogene Wirkung auf, reagieren die Zellen mit einer stark vergrößerten Membranoberfläche (Zunahme der Mikrovilli) (um diesen Effekt zu verdeutlichen können zusätzliche Stimulanzien, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Eine solche Zunahme lässt sich über eine Erhöhung in der spezifischen Membrankapazität C_m ermitteln. Die Elektrorotation der Zellen unter Wirkung hochfrequenter elektrischer Felder bietet eine Möglichkeit, diese Veränderungen der Lymphozytmembran auf dem Einzelzellniveau nachzuweisen. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginaten lässt sich keine Erhöhung der spezifischen Membrankapazität messen, wohingegen bei kommerziellen Alginaten eine Erhöhung dieses Wertes nachweisbar ist.

Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen ausgeführt. Die Lymphozytenzellsuspension ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Complete Growth Medium) wird mit einer Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) versetzt und 3 Tage bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Danach wird die Suspension 2 x in isoosmolaler Inositollösung (290 mOsm/kg) gewaschen, anschließend gut resuspendiert. Bei verschiedenen Leitfähigkeiten (10, 25, 40 µS/cm), eingestellt mit HEPES-KOH, pH 7,2) erfolgt die Bestimmung der charakteristischen Frequenz (Maximum) der Antifeldrotation mittels der Kompensationsmethode. Mit Hilfe einer linearen Regression der mit dem Zellradius normierten charakteristi-

schen Frequenzen, aufgetragen gegen die externe Leitfähigkeit, kann man die elektrischen Parameter (Kapazität und Leitfähigkeit) der Plasmamembran bestimmen. Die elektrischen Parameter der in Anwesenheit erfindungsgemäßer Alginate kultivierten Zellen bleiben unverändert, wohingegen die mit kommerziellen Alginate kultivierten Zellen eine Zunahme der Membrankapazität um 10 bis 50 % aufweisen.

8. Zellgröße und Zellzahl

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginate kann auch mit folgendem Test gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Human-Lymphozyten oder Maus-Lymphozyten werden für einige Tage mit Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginate eine immunogene Wirkung auf, so vergrößern sich die Zellen und es erhöht sich die Anzahl der Zellen (um diesen Effekt zu verdeutlichen, können zusätzliche Stimulanzien, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Die Zellgröße und die Zellzahl kann mit Hilfe des CASY1 Cell Analyzer (Model TTC, Schärfe Technology, Reutlingen, Deutschland), der nach dem Coulter Prinzip arbeitet, ermittelt werden. Ein solches Gerät erlaubt die schnelle, genaue Erfassung (Größe, Größenverteilung und Zellzahl) mehrerer tausend Zellen pro Messung. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginaten lässt sich keine signifikante Zellvergrößerung und Erhöhung der Zellzahl nach Inkubation messen, wohingegen bei kommerziellen Alginate eine deutliche Zellvergrößerung (rd. 50 %) und eine erhöhte Zellzahl (35 bis 50 %) nachweisbar ist.

Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Lymphozytensuspension ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Complete Growth Medium) wird mit einer Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) versetzt und 3 Tage bei 5% CO₂ und 37°C kultiviert. Danach wird ein abzentrifugiertes und in Inositol (oder

PBS) aufgenommenes Aliquot (100 µl) der gut resuspendierten Lymphozytensuspension 2 x in isoosmolaler Inositollösung (290 mOsm/kg) gewaschen und in 10 ml PBS (phosphatgepufferte Saline) aufgenommen und sofort im CASY1 gemessen. Aus den CASY-Histogrammen kann der Anteil der großen, stimulierten Zellen an der Gesamtpopulation berechnet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung einer hochgereinigten Alginatzusamensetzung, mit den Schritten:

- Extrahieren von Algenmaterial oder Rohalginat in einer Lösung mit einem Komplexbildner,
- Filtern der Lösung,
- Ausfällen von Alginat aus der Lösung, und
- Sammeln des gefällten Alginats.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum Extrahieren als Komplexbildner Ethylendiaminentetraessigsäure verwendet wird.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem das Extrahieren in einer Sodalösung erfolgt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, bei dem zum Extrahieren der Lösung Aktivkohle zugesetzt wird.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem vor dem Filtern der Lösung ein Sedimentieren von Zellbestandteilen und Partikeln mit einem porösen Bindemittel aus der Lösung erfolgt.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem das Sedimentieren mit einem porösen Granulat auf der Basis von Kieselgur, Zellulose oder Recycling-Materialien aus nachwachsenden Rohstoffen erfolgt.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Filtern mit Tiefenfiltern jeweils abnehmender Porengröße erfolgt.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Ausfällen von Alginat mit Ethanol erfolgt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 6, bei dem der Ethanolgehalt im Bereich von 10-50 % gewählt ist.

10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Sammeln des ausgefällten Alginats durch Aufschäumen aus der Lösung, durch Dekantieren der Lösung oder durch Rühren der Lösung mit einer Rühr- und Sammeleinrichtung erfolgt.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Entwässern des Alginats bei Raumtemperatur erfolgt.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem nach dem Entwässern das Extrahieren, Filtern, Fällen und Entwässern mindestens einmal wiederholt wird.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial in der Natur vorkommende Algenfrischmaterial oder in einem Bioreaktor bzw. Tankanlage kultiviertes Algenfrischmaterial oder Algenmaterial aus fusionierten oder regenerierten Algenzellen oder kommerzielles Alginat verwendet wird.

14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen oder Algenteile bzw. bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen oder Algenteilen aus bestimmten Stadien des Entwicklungszyklus von Algen verwendet werden.

15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial Braunalgen oder andere alginatproduzierende Süßwasser- oder Salzwasseralgen verwendet werden.

16. Alginatzusammensetzung, die als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure besteht,
dadurch gekennzeichnet, daß im Mischpolymer ein Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure im Bereich von 1% bis 90% gegeben ist und das mittlere Molekulargewicht des Mischpolymers größer als 250 kD ist.
17. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung mit einer 0.1%-igen Konzentration eine Viskosität im Bereich von 10 bis 15 mPa · s besitzt.
18. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung mit einer 0.5%-igen Konzentration eine Viskosität von 250 bis 300 mPa · s besitzt.
19. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge von 366 nm im Spektralbereich von 380 bis 550 nm keine Fluoreszenzemission zeigt.
20. Alginatzusammensetzung, die bei Farbtests mit der Folin-Denis-Reagenz oder mit Dimethoxybenzaldehyd keine Einfärbung zeigt.
21. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge von 270 nm im Spektralbereich von 300 bis 500 nm keine Fluoreszenzemission zeigt.
22. Alginatzusammensetzung, die keine mit dem photometrischen Proteinnachweis nach Bradford nachweisbaren Proteine enthält.
23. Alginatzusammensetzung, die bei Implantation in die Nieren von BB/OK-Ratten keine signifikante immunologische Reaktion auslöst.

24. Alginatzusammensetzung, die nach Anwendung des XTT/MTT-Tests, oder der Zellrotationsmethode, oder einer elektrischen Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung zu keiner nachweisbaren Lymphozytenaktivierung führt.
25. Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 24, die nach einem der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 hergestellt ist.
26. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für die Transplantationschirurgie und für andere medizinische Anwendungen und für die Lebensmittelindustrie.
27. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für allogene und xenogene Gewebe.
28. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für Langerhans'sche Inseln, Nebenschilddrüsenge-
webe, endokrines Gewebe oder dopamin-sezernierende Zellen.

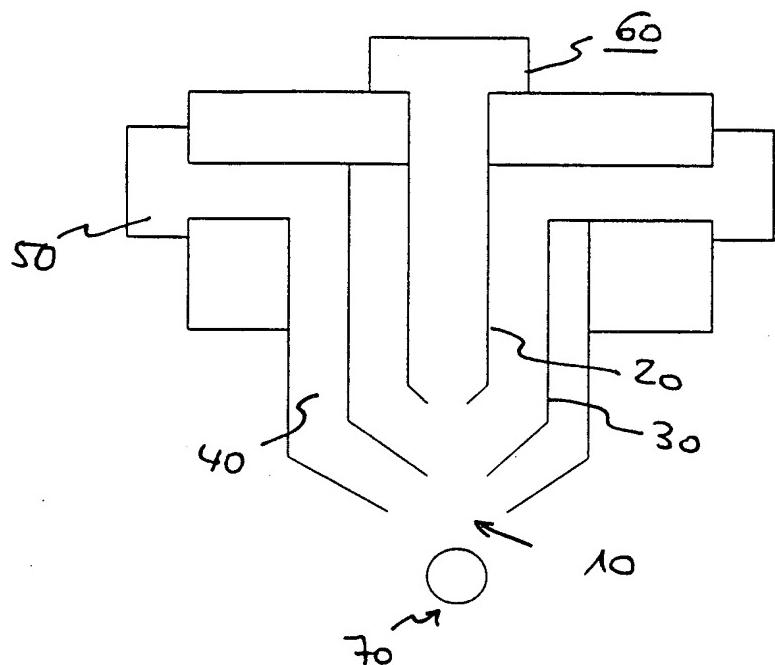
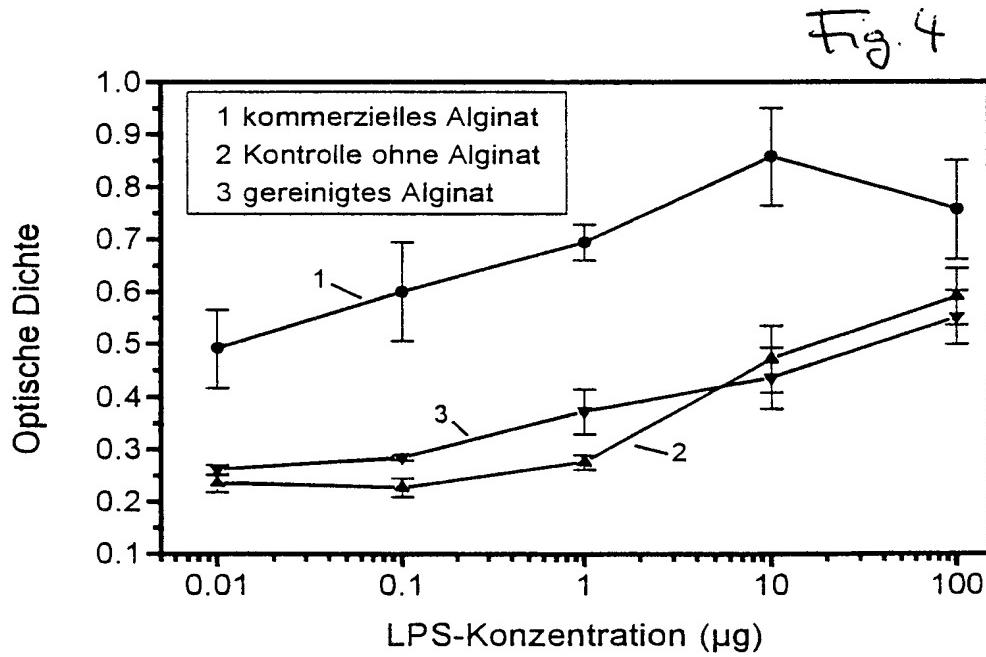


Fig. 1



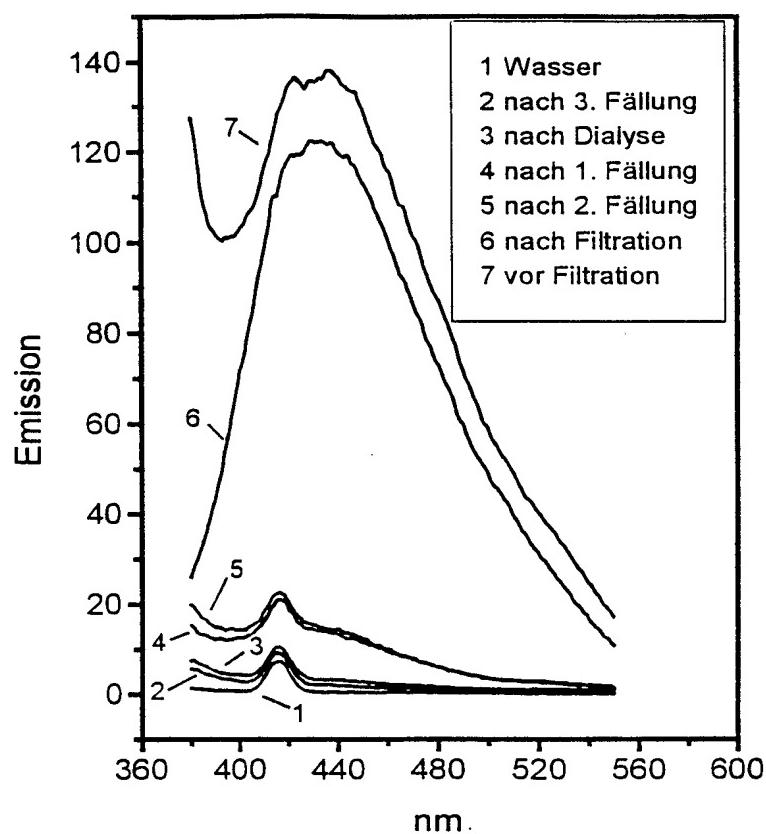


Fig. 2

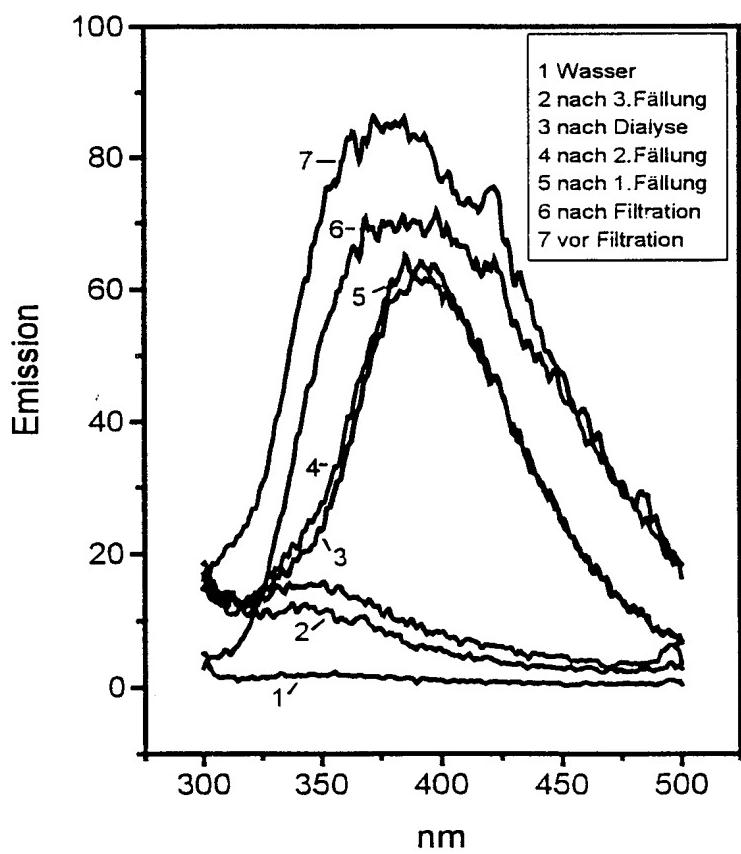


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/05867

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C08B37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 24077 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9 December 1993 (1993-12-09) page 10, line 13 -page 11, line 26 ---	1-28
A	KLOCK G ET AL: "Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates" BIOMATERIALS, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, vol. 18, no. 10, page 707-713 XP004063784 ISSN: 0142-9612 ---	
A	WO 93 16111 A (ZIMMERMANN ULRICH) 19 August 1993 (1993-08-19) -----	

Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

11 November 1999

26/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lensen, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05867

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 9324077	A 09-12-1993	US	5429821	A	04-07-1995
		AU	4409793	A	30-12-1993
		CA	2135770	A	12-09-1993
		EP	0642326	A	15-03-1995
		JP	7507550	T	24-08-1995
		US	5578314	A	26-11-1996
		US	5643594	A	01-07-1997
		US	5693514	A	02-12-1997
-----	-----	-----	-----	-----	-----
WO 9316111	A 19-08-1993	DE	4204012	A	19-08-1993
		AT	150469	T	15-04-1997
		DE	59305882	D	24-04-1997
		DK	626974	T	23-06-1997
		EP	0626974	A	07-12-1994
		ES	2101299	T	01-07-1997
		GR	3023797	T	30-09-1997
		JP	7503985	T	27-04-1995
-----	-----	-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05867

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C08B37/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C08B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 24077 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9. Dezember 1993 (1993-12-09) Seite 10, Zeile 13 -Seite 11, Zeile 26 ---	1-28
A	KLOCK G ET AL: "Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates" BIOMATERIALS, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, Bd. 18, Nr. 10, Seite 707-713 XP004063784 ISSN: 0142-9612 ---	
A	WO 93 16111 A (ZIMMERMANN ULRICH) 19. August 1993 (1993-08-19) -----	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11. November 1999

26/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lensen, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05867

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9324077	A 09-12-1993	US	5429821 A	04-07-1995
		AU	4409793 A	30-12-1993
		CA	2135770 A	12-09-1993
		EP	0642326 A	15-03-1995
		JP	7507550 T	24-08-1995
		US	5578314 A	26-11-1996
		US	5643594 A	01-07-1997
		US	5693514 A	02-12-1997
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9316111	A 19-08-1993	DE	4204012 A	19-08-1993
		AT	150469 T	15-04-1997
		DE	59305882 D	24-04-1997
		DK	626974 T	23-06-1997
		EP	0626974 A	07-12-1994
		ES	2101299 T	01-07-1997
		GR	3023797 T	30-09-1997
		JP	7503985 T	27-04-1995
-----	-----	-----	-----	-----